



EFW

Docket No.: NHL-NP-46  
Serial No.: 10/816,591

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

EXAMINER: Anne Marie Sabrina Wehbe  
ART UNIT: 1653  
SERIAL NO.: 10/816,591  
FILING DATE: April 1, 2004  
INVENTORS: Laura FUERTES-LÓPEZ and Marcos TIMÓN-JIMÉNEZ  
TITLE: DNA EXPRESSION CONSTRUCT FOR THE TREATMENT OF INFECTIONS WITH LEISHMANIASIS

Greensburg, Pennsylvania 15601

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

February 6, 2007

**TRANSMITTAL LETTER**

Sir:

Please find enclosed herewith the following documents relating to the above-cited case:

- 1) a certified copy of Federal Republic of Germany Patent Application No. 101 56 679.4, filed on November 12, 2001; and Federal Republic of Germany Patent Application No. 101 48 732.0, filed on October 2, 2001.
- 2) a stamped, self-addressed postcard, return of which is requested to acknowledge receipt of the enclosed documents.

Docket No.: NHL-NP-46  
Serial No.: 10/816,591

TRANSMITTAL LETTER  
Page 2

It is believed that no fee is required to file the enclosed documents.

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on February 6, 2007.

Respectfully submitted,



Nils H. Ljungman, Esq.  
Attorney for Applicant[s]  
Reg. No. 25,997  
Name of person signing certification  
Nils H. Ljungman & Associates  
P.O. Box 130  
Greensburg, PA 15601-0130  
Telephone: (724) 836-2305  
Facsimile: (724) 836-2313

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on February 6, 2007.



Sara A. Yantko  
Signature

Sara A. Yantko  
Name of person mailing paper or fee

2. 6. 07

Date

# DEUTSCHE FEDERATION DER REPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung DE 101 56 679.4 über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 56 679.4

Anmeldetag: 12. November 2001

Anmelder/Inhaber: MOLOGEN Forschung-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

Bezeichnung: Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major

Priorität: 02. Oktober 2001 DE 101 48 732.0

IPC: A 61 K 48/00; A 61 P 33/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. November 2006  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

X Stark

### **Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major**

#### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Immunisierung gegen Leishmaniose auf DNA-Basis.

- Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden.
- 5 Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an viceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste
- 10 parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken.

Chemotherapie als Behandlungsmethode zeigt nur einen geringen Effekt.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

- 15 Das Prinzip der Immunisierung beruht auf der Wiedererkennung von Strukturen bereits erfolgreich bekämpfter Erreger. Zwei Hauptarme der Immunabwehr können dabei unterschieden werden: der humorale, welcher auf der Synthese von Antikörpern beruht, die in der Lage sind, im extrazellulären Raum befindliche Bakterien zu

bekämpfen und der zelluläre, der im Wesentlichen auf der Aktivität von T-Lymphozyten des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Die humorale Immunabwehr wird auch als Th2 pathway und die zelluläre Immunabwehr als Th1 pathway bezeichnet. Die Impfung 5 bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1 typischen Immunreaktion möglich sein. Im Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1 Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4( 12): 1409-15). Zur Förderung 10 der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerlässliches Adjuvant verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. BALB/c Mäuse sind ein gutes Modell zum Studium der Leishmaniose. Es bestehen 15 im Infektionsverlauf und der Läsionsentwicklung sehr große Ähnlichkeiten zum Menschen. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 20 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). LACK ist ein 36 kDa Antigen von Leishmanien, das hochkonserviert ist und in allen verwandten Leishmaniaarten zu finden ist. Exprimiert wird es sowohl in der parasitären Promastigote und Amastigote, den beiden Stadien des 25 parasitären Zyklus im Wirt. Um die Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1 zu fördern, setzten Gonzalo et al. Vaccinia Virus als virale Genfähre und IL-12 als Adjuvant ein. Als Immunogen wurde p36/LACK Antigen benutzt. Verschiedene Impfregime wurden zusammengestellt. Das erfolgreichste Impfregime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit Vaccinia Virus, kodierend für p36 und 30 IL-12, führte zu einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen. Den größten Infektionsschutz wiesen die Tiere auf, die den höchsten IgG2a Antikörpertiter hatten (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

Zum Einschleusen der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

- Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfählen, sind virale Vektoren, Plasmide
- 5 oder kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, die im folgenden MIDGE® genannt werden (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0914 318 B1).

- Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Sie enthalten neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige
- 10 DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Diese bakterielle DNA hat den Nachteil, dass sie immunstimulatorische Sequenzen ("ISS", z.B. nichtmethylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide, „CpG“) enthalten kann. Bei Immunsuppression ist genau diese Wirkung nicht erwünscht (ausführlich beschrieben in DE 199 35 756). Bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA besteht zudem das inhärente Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist.

- Die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz am häufigsten eingesetzten Genfählen sind virale Vektoren. Jedoch stehen die mit deren Einsatz verbundenen Sicherheitsrisiken einer breiten Anwendung in erheblichem Maße entgegen. Es ist bekannt, dass ein hohes Risiko einer cytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfigurierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen. Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.

- Neben diesen Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt
- 30 sind, ist es bisher trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfschutz gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches ein sicheres, effektives und schützendes Impfen gegen Leishmaniose ermöglicht.

- Die Aufgabe wird durch die Merkmale des unabhängigen Anspruchs gelöst, insbesondere indem das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Diese besteht aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls Terminationssequenzen, so dass das Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält (vgl. EP 0 941 318 B1). Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass das Genexpressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist, welches vorzugsweise eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere
- 15     • Die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin = Seq ID 3) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.
- 20     • oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR = Seq ID 2) des HIV-1 Genprodukts TAT.

- Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten.
- 25     Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben und diskutiert.

Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

pMOK p36	Plasmid kodierend für p36 Antigen
Mp36-NLS	MIDGE kodierend für p36 Antigen mit NLS Peptid gekoppelt
pMOK ctr	Kontrollplasmid kodierend für HBsAg
rVVp36	rekombinanter Vaccinia Virus kodierend für p36
5 Phosphat	Phosphatpuffer als Kontrolle
Kontrolle +	Positivkontrolle, mit L. major infizierte Seren von Mäusen
Kontrolle -	Negativkontrolle, Seren unbehandelter Mäuse

Es zeigt:

- Fig. 1: die Bestimmung des Gesamt IgG Titer vor Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten. Nur die Impfregime, die eine Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus beinhalten, zeigen einen messbaren Antikörpertiter.
- Fig. 2: Bestimmung des Gesamt IgG Titer nach Belastungsinfektion. Alle Impfprotokolle zeigen eine meßbare Antikörperantwort, wobei der höchste Titer an zirkulierenden Antikörpern von MIDGE p36-NLS / MIDGE p36-NLS ausgelöst wird.
- Fig. 3: das Verhältnis der Antikörper-Isotypen IgG 2a und IgG 1 nach Zweitimmunisierung und Belastungsinfektion mit L. major Promastigoten. Überraschenderweise lösen die mit dem NLS-Peptid gekoppelten MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung zytotoxische Immunantwort (Th1) aus, die sich von der durch das Regime pMOKp36/rVVp36 ausgelösten nur gering unterscheidet.
- Fig.4: die Entwicklung der Läsionen in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Belastungsinfektion. Dabei bewirken die Impfprotokolle basierend auf MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS und pMOK p36/ rVV p36 den längsten Schutz gegen eine Infektion mit Leishmania major. Die Schutzwirkung wird durch eine deutlich verzögerte Läsionsentwicklung sichtbar. Der wirksamste und langanhaltende Schutz wird jedoch durch MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht.

Fig. 5: die Größe der Läsionen nach Woche 8. In der achten Woche nach der Belastungsinfektion ist die Läsionsgröße bei den mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS geimpften Tieren um 80% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe. Es konnte sogar eine 11 prozentige Steigerung des Schutzes vor L. major im Vergleich mit der mit pMOK p36/rVV p36 geimpften Gruppe festgestellt werden.

5 Im einzelnen:

Es wurde untersucht, ob die Modifikation der minimalistischen Expressionskassetten mit Peptiden eine Änderung der Stärke oder Ausrichtung der Immunantwort zu erreichen vermag. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde versucht, verschiedene Peptide und andere organische Moleküle an die MIDGE kovalent zu koppeln.

10 So ist es gelungen durch kovalente Kopplung des Kernlokalisationssignals (NLS) aus dem SV 40 Virus an für HBsAg kodierende MIDGE, einen 10- bis 15-fach erhöhten Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachzuweisen (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun.79 (5-6): 343-50).

15 In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Genexpressionskonstrukte, die für das Antigen p36 LACK kodierten, getestet. So wurden mit NLS Peptid gekoppelte MIDGE (MIDGE p36-NLS), Plasmid (pMOKp36) und rekombinanter Vaccinia Virus (rVVp36) eingesetzt. Um einen möglichst hohen Immunschutz zu erreichen, wurden verschiedene Impfregime formuliert. Parameter waren die Stärke des Th2/Th1 shifts und die erreichte Schutzwirkung, die anhand der Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten ermittelt wurde. Neben der aus dem Stand der Technik bekannten Methode der Erstimmunisierung mit Plasmid und der Zweitimmunisierung mit rekombinantem Vaccinia Virus (rVV), 20 sollte getestet werden, ob ein ähnlicher Immunschutz auch mit dem erfindungsgemäßen Arzneimittel erreicht werden kann.

25 Die Antikörpertiter für Gesamt IgG als Maß für die Auslösung einer Immunantwort wurden mittels ELISA bestimmt. Dabei konnten vor der Belastungsinfektion mit Leishmania major Promastigoten nur durch zwei Impfregime messbare Antikörper erzeugt werden (s. Fig. 1). In beiden Fällen wurde rekombinanter Vaccinia Virus als

Zweitimmunistaion (Boost) verwendet. Verschiedene Studien beweisen, dass zirkulierende Antikörper allein noch nichts über eine vermeintliche Schutzwirkung aussagen. Ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden Antikörpern und Schutz vor Infektion kann erst nach der Belastungsinfektion gesehen werden. In Fig. 2 sind die Antikörpertiter nach der Belastungsinfektion mit *L. major* dargestellt. Alle Impfregime zeigen meßbare Antikörpertiter, wobei der höchste mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht werden konnte.

Die Antikörperisotypen IgG1 und IgG2a wurden bestimmt, um einen möglichen Th2/Th1 shift in der Immunantwort nachzuweisen. Die Isotopenverteilung von Immunglobin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wider. Dabei sind IgG –1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten, ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFNy und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

Gemäß Fig. 3 sind mit dem NLS Peptid gekoppelte MIDGE Vektoren in der Lage, eine zelluläre (Th1) Immunantwort auszulösen. Wie dargestellt, ist der zelluläre Arm der Immunantwort entscheidend in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten. Die von MIDGE p36-NLS ausgelöste Verschiebung der Th2 in Richtung Th1 Antwort, unterscheidet sich nur gering von der durch pMOKp36/rVVp36 ausgelösten.

Zur Beurteilung der erreichten Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit *Leishmania major* Promastigoten durchgeführt. Anhand des Größenwachstums der Läsionen in Abhängigkeit von der Zeit in Wochen wurde der Impferfolg bewertet. Dabei zeigte sich, daß die mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS behandelten Mäuse die vom Durchmesser kleinsten Läsionen aufwiesen, also MIDGE p36-NLS im Impfregime MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS den längsten Impfschutz bewirkt (s. Fig. 4 u. 5).

Diese Ergebnisse sind insofern sehr überraschend, da das erfindungsgemäße Arzneimittel in seiner Wirkung das derzeit im Stand der Technik als „bestes“ bezeichnete

- te Impfregime der Zweitimmunisierung (Boost) mit rekombinanten Vaccinia Virus übertrifft, und die möglichen Nebenwirkungen, die von Plasmiden und attenuierten Viren ausgehen, vermeidet (Gonzalo et al., Microbes and Infection:3 (9) :701-711). Gleichzeitig ist das erfindungsgemäße Arzneimittel vergleichbar bis besser, in seiner
- 5 Schutzwirkung. Die Vermeidung von potentiellen Nebenwirkungen durch Plasmide und rekombinanten Viren, ist der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Arzneimittels, die Herstellung ist einfacher und kostensparender, zudem ist das erfindungsgemäße Mittel wesentlich sicherer.

#### Ausführungsbeispiele

- 10 **Beispiel 1.1:** Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 6),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTTCCGTG  
15 (= Seq ID 7)

2. PCR ca. 950 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 8),

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTTTACTCGGCCGTCGGAGATGG (= Seq ID 9)

- Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere  
20 Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit BpI geschnitten.

- Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammengefügten und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den  
25 Namen pMOKp36 (= Seq ID 1).

Beispiel 1.2: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C<sub>2</sub> – Amminolinker steht, = ODN 1 = Seq ID 4) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE p36-NLS Konstrukte verwendet.

15    Beispiel 1.3: Herstellung der MIDGE p36-NLS

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOKp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1 = Seq ID 4) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2 = Seq ID 5) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Beispiel 1.4: p36 Antikörperbestimmung in Mäusen

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (rVV) wurden in weibliche (Balb/c) Mäuse nach folgendem Impfregime injiziert.

30    Tabelle 1

Gruppen	Erstimmunisierung (prime)	Zweitimmunisierung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS
3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	rVVp36
5	MIDGE p36-NLS	rVVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

Die verwendeten DNA Mengen betrugen für:

pMOKp36: 100µg, i.d.

MIDGE p36-NLS: 54,8µg, i.d.

5 rVV p36: 5x10<sup>7</sup> pfu/Maus, i.p.

und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, injiziert.

Nach 2 Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost) mit den entsprechenden (s. Tab. 1) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungsinfektion mit 5x10<sup>4</sup> Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in 10 die rechte Hinterpfote s.c. injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt.

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper, erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 406$  nm bestimmt wurde. 15

### Patentansprüche

- 5        1. Arzneimittel zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel ein in eukaryoten Zellen operables Genexpressionskonstrukt enthält, welches für das immunogene p36 LACK Antigen unter Kontrolle einer Promotersequenz kodiert.
- 10      2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Genexpressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.
- 15      3. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören.
- 20      4. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Kernlokalisationssequenz trägt.
- 25      5. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) enthält.
6. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz YGRKKRRQRRR enthält.
- 20      7. Arzneimittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Genexpressionskonstrukt ein linear-doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäuremolekül ist, welches an beiden Enden des Doppelstrangs durch eine kurze Schleife einzelsträngiger Nukleosidreste kovalent geschlossen ist.
- 25      8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1 bis 8 zur Immunisierung gegen Leishmaniose.

Fig. 1 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen vor der Belastungsinfektion mit *L. major*

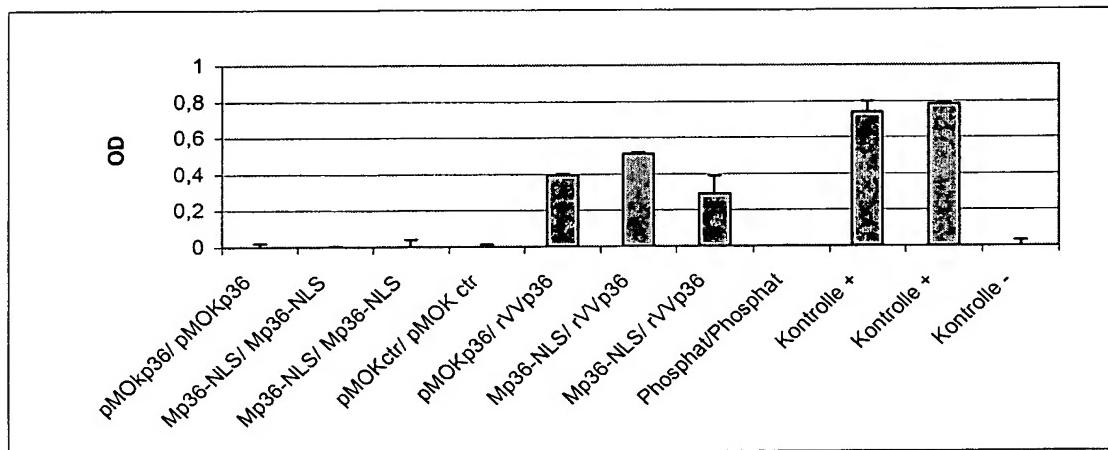


Fig. 2 Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 LACK Antigen nach der Belastungsinfektion mit *L. major*

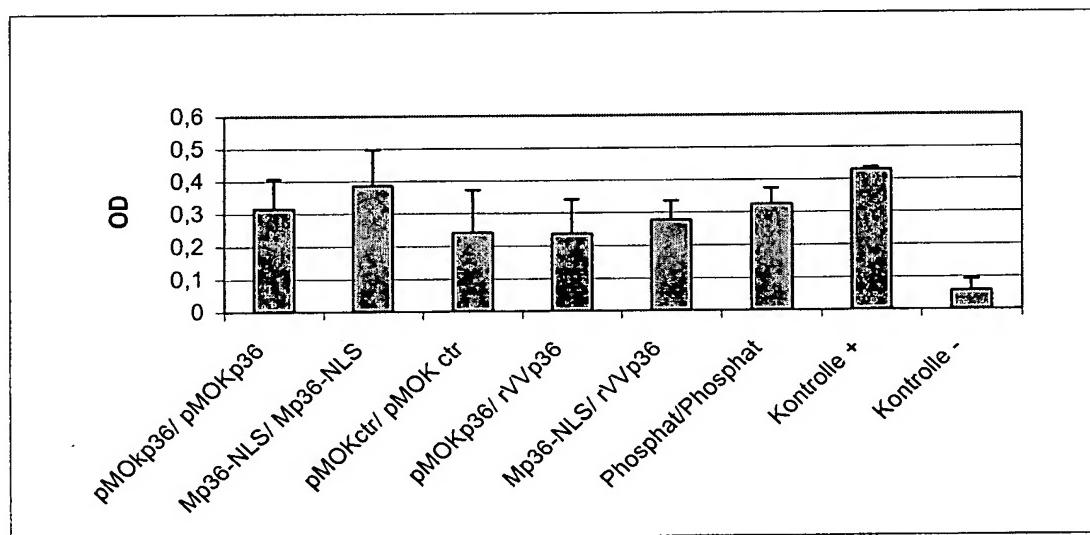


Fig. 3 Verhältnis der Isotypen IgG 2a/IgG 1 gegen p36 LACK Antigen

Impfregime	Isotypenverhältnis
pMOKp36/pMOKp36	0.9
Midge p36-NLS/Midge p36-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVVp36	1.66
Midge p36-NLS/rVVp36	1.35
Phosphatpuffer/Phosphatpuffer	0.96

Fig. 4 Kinetik der Läsionsentwicklung

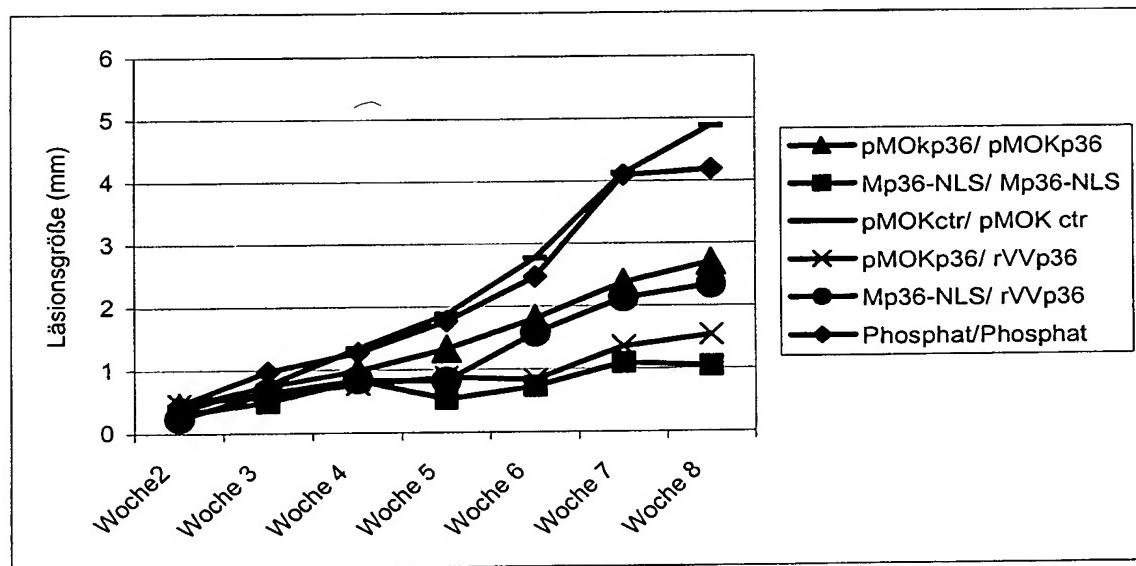
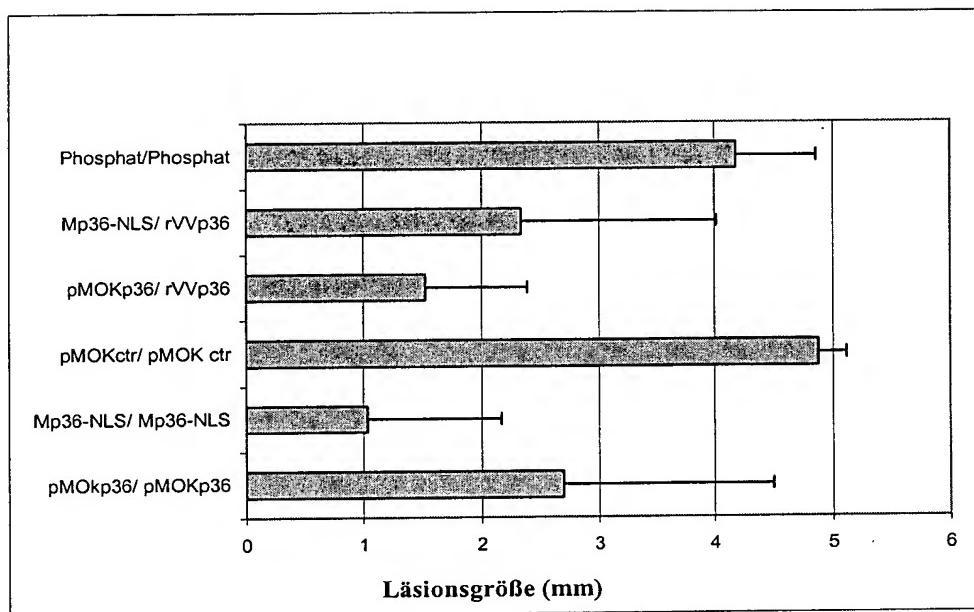


Fig. 5 Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion in Woche 8



## **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Immunisierung gegen Leishmaniose auf DNA-Basis, wobei das immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene Expressionskassette verwendet. Das Genexpressionskonstrukt kann zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.

Mologen-Leishmania.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

<130> XI 628/01

<150> DE 101 48 697.9

<151> 2001-10-02

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4791

<212> DNA

<213> Plasmid pScp36

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1939)..(1045)

<223> Kanamycin resistance, reverse complementary

<220>

<221> promoter

<222> (2447)..(3243)

<223> CMV

<220>

<221> Intron

<222> (3250)..(3386)

<223>

Mologen-Leishmania.ST25

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3393)..(4331)  
<223> p36 protein

<220>  
<221> polyA\_site  
<222> (4338)..(4539)  
<223> poly A site aus SV 40

<400> 1 tcttcgcctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgct gcgagcggta 60  
tcagctcaact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcatggaaag 120  
aacatgtctc gggaggcctc acgtgacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 180  
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 240  
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 300  
tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 360  
ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg gcgccttctc atagctcacg ctgttaggtat 420  
ctcagttcgg tgttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgacgaaacc ccccggtcag 480  
cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 540  
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgttaggcgg 600  
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttgg 660  
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 720  
aaacaaacca cgcgtggtag cggtggttt ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 780  
aaaaaaggat ctcagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC 840  
gaaaactcac gttaaggat tttggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 900  
ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggct 960  
gacagttacc aatgcttaat cagtggggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 1020  
tccatagttg cctgactccc cgtctcagaa gaactcgta agaaggcgat agaaggcgat 1080  
gcgcgtcgaa tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc 1140  
gccaagctct tcagcaatat cacgggttagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgcccac 1200  
acccagccgg ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg 1260  
caagcaggca tcgcccattgg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc tcgcctttag 1320  
cctggcgaac agttcggctg ggcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc 1380

Mologen-Leishmania.ST25

gacaagaccg	gcttccatcc	gagtacgtgc	tcgctcgatg	cgatgtttcg	cttgggtggc	1440
gaatggcag	gtagccggat	caagcgtatg	cagccgccgc	attgcatacg	ccatgatgga	1500
tactttctcg	gcaggagcaa	ggtgagatga	caggagatcc	tgccccggca	cttcgccccaa	1560
tagcagccag	tcccttcccg	cttcagtgac	aacgtcgagc	acagctgcgc	aaggaacgccc	1620
cgtcgtggcc	agccacgata	gccgcgctgc	ctcgcttgc	agttcattca	gggcaccggaa	1680
caggtcggtc	ttgacaaaaaa	gaaccgggcg	cccctgcgct	gacagccgga	acacggcggc	1740
atcagagcag	ccgattgtct	gttgtgcccc	gtcatacgccg	aatagcctct	ccacccaagc	1800
ggccggagaa	cctgcgtgca	atccatcttgc	ttcaatcata	atattattga	agcatttata	1860
agggttatttgc	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	tttagaaaaat	aaacaaaatag	1920
gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	ctaagaaacc	attattatca	1980
tgacattaac	ctataaaaaat	aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtctcgccg	cgttcggtg	2040
atgacggtga	aaacctctga	cacatgcgc	tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgttaag	2100
cggatgccgg	gagcagacaa	gcccgtcagg	gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	2160
gctggcttaa	ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgcggtgt	2220
aaataccgca	cagatgcgt	aggaaaaat	accgcatacg	gcgcatttcg	ccattcaggc	2280
tgcgcactg	ttgggaaggg	cgatcggtgc	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	2340
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	ggtaacgccc	agggttttcc	cagtcacgac	2400
gttgtaaaac	gacggccagt	gccaagcttgc	gtctccccc	ggatcctcaa	tattggccat	2460
tagccatatt	attcattgg	tatatacgat	aaatcaatat	tggctattgg	ccattgcata	2520
cgttatct	atatcataat	atgtacattt	atattggctc	atgtccaata	tgaccgccc	2580
gttggcatttgc	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	tacggggtca	ttagttcata	2640
gccccatatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	tggccgcct	ggctgaccgc	2700
ccaacgaccc	ccgcccatttgc	acgtcaataa	tgacgtatgt	tcccatacgta	acgccaatag	2760
ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtggagt	atttacggta	aactgcccac	ttggcagtac	2820
atcaagtgt	tcatatgcca	agtccgcccc	ctattgacgt	aatgacgggt	aaatggcccg	2880
cctggcatta	tgcccagttac	atgaccttac	gggactttcc	tactggcag	tacatctacg	2940
tattagtcat	cgctattacc	atggtgatgc	ggttttggca	gtacaccaat	gggcgtggat	3000
agcggtttgc	ctcacgggaa	tttccaagtc	tccacccat	tgacgtcaat	gggagttgt	3060
tttggcacca	aatcaacgg	gactttccaa	aatgtcgtaa	taaccccgcc	ccgttgacgc	3120
aatgggcgg	taggcgtgt	cggtgggagg	tctatataag	cagaggtcgt	ttagtgaacc	3180
gtcagatcac	tagaagcttt	attgcggtag	tttatcacag	ttaaattgct	aacgcagtca	3240
gtgctcgagc	aggtaagtat	caaggttaca	agacaggttt	aaggaggcca	atagaaaactg	3300
ggcttgcga	gacagagaag	actcttgcgt	ttctgtatagg	cacctattgg	tcttactgac	3360
atccactttgc	cctttctctc	cacaggggt	ccatgaacta	cgagggtcac	ctgaaggccc	3420

Mologen-Leishmania.ST25

accgcggatg ggtcacccctcc	ctggcctgcc	cgcagcaggc	ggggtcgtac	atcaaggtgg	3480
tgtcgacgtc	gcgcgatggc	acggccatct	cgtggaaagc	caaccccgac	3540
tggacagcga	ctacggctcg	ccgagccacc	gcctcgaggg	ccacaccggc	3600
gtgtgtcgct	ggcccacgcc	accgactacg	cgctgaccgc	gtcctgggac	3660
gcatgtggga	cctgcgcaat	ggccagtgcc	agcgcagtt	cctgaagcac	3720
tgctcgccgt	cgccttctcg	ccggacgacc	gcctgatcgt	gtccgcgggc	3780
tgatccgcgt	gtggAACGTG	gccccggcagt	gcatgcacga	gttcctgcgc	3840
aggactgggt	gagcagcatc	tgtttctcgc	cgtcgctgga	gcatccgatc	3900
gcagctggga	caacaccatc	aaggtatgga	acgtgaacgg	ggcaagtgt	3960
tcaagggccca	cagcaactac	gtgtccacgg	tgacgggtgc	gccagacggg	4020
cgtccggcgg	caaggacggc	gccccggcgtgc	tgtggacacct	gagcaccggc	4080
tcaagatcaa	cgtggagtcg	cccatcaacc	agatgcctt	ctcgcccaac	4140
tgtgcgtcgc	gacggagagg	tccctgtccg	tgtacgacct	ggagagcaag	4200
cggagctgac	gccggacggc	gcaagccgt	ccgagtgcac	ctccattgcc	4260
acggcaacac	tctgtactcc	ggtcacaagg	acaacctgat	ccgcgtgtgg	4320
acgcccagta	agagctcgat	gagtttggac	aaaccacaac	tagaatgcag	4380
gctttatttg	tgaaatttgt	gatgctattt	ctttatttgt	aaccattata	4440
aacaagttaa	caacaacaat	tgcattcatt	ttatgtttca	ggttcagggg	4500
aggtttttta	aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggtag	aattcagggg	4560
tcgtaatcat	ggtcatacgat	gttccctgtg	tgaaatttgtt	atccgctcac	4620
aacatacgag	ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggtg	cctaattgagt	4680
acattaattt	cgttgcgctc	actgcccgt	ttccagtcgg	gaaacctgtc	4740
cattaatgaa	tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggttgc	gtattggcgc	4791

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1, TAT peptide

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 3

<211> 7

Mologen-Leishmania.ST25

<212> PRT

<213> Simian virus 40, NLS peptide

<400> 3

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 1

<220>

<221> modified\_base

<222> (12)..(12)

<223> xT = Thymin modified with a reactive amino group

<400> 4

gggagtccag ttttctggac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> ODN 2

<400> 5

agggtccag ttttctggac

20

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer left

<400> 6

ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct

33

<210> 7

<211> 42

Mologen-Leishmania.ST25

<212> DNA

<213> 1. PCR: Primer right

<400> 7  
ttatatgagc tcagaagaca cggacaggga cctcttccgt cg

42

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer left

<400> 8  
ttatcatggta ccatgaacat acgagggtca cct

33

210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> 2. PCR: Primer right

<400> 9  
ttatatgagc tcttactcggtccgtcgaga tgg

33